



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 37 687 A 1**

⑥ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 Q 1/68**  
C 12 M 1/34  
G 01 N 33/483  
G 01 N 35/00

⑲ Aktenzeichen: 100 37 687.8  
⑳ Anmeldetag: 1. 8. 2000  
㉑ Offenlegungstag: 14. 2. 2002

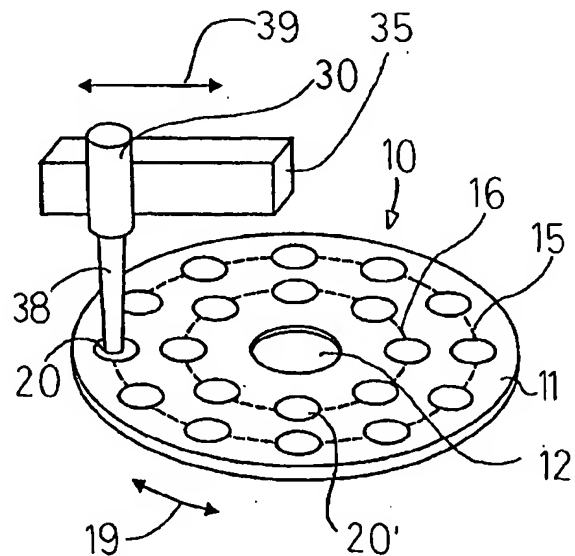
DE 100 37 687 A 1

⑦ Anmelder:  
TRACE Biotech AG, 38124 Braunschweig, DE  
  
⑦A Vertreter:  
Eisenführ, Spelser & Partner, 28195 Bremen

⑦B Erfinder:  
Künnecke, Wolfgang, Dr., 38116 Braunschweig, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤A Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotid-Arrays und zur Durchführung von Hybridisierungs-Assays sowie Anlagen zur Durchführung dieser Verfahren
- ⑤B Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays auf einer Träger-Disk 10, wobei auf einer Untersuchungssseite 11 Kupplungsorte vorgesehen sind, an denen die Oligonucleotide seriell mit der Disk verknüpft werden. Der Oligonucleotid-Array kann in Hybridisierungs-Assays verwendet werden. Zum Herstellen des Arrays wird die Disk rotiert und/oder werden Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander verschoben. Die Auswertung eines Hybridisierungs-Assays erfolgt auf analoge Weise.



DE 100 37 687 A 1

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotid-Arrays und zur Durchführung von Hybridisierungs-Assays sowie Anlagen zur Durchführung dieser Verfahren.

[0002] Mit dem Fortschreiten der molekulargenetischen Kenntnisse, beispielsweise im Human Genome Project, ist ein rasches Anwachsen der Zahl bekannter DNA-Sequenzen verbunden. Mit den gewonnenen Sequenz-Informationen lassen sich spezifische Nucleinsäuren (DNA, RNA oder chemisch modifizierte Nucleinsäuren) herstellen, mit denen in Hybridisierungs-Verfahren beispielsweise pathogene Bakterien oder das Vorliegen von Mutationen (Gen-Diagnostik) detektiert und gegebenenfalls identifiziert werden können.

[0003] Wegen der hohen Aussagesicherheit solcher Hybridisierungs-Assays werden Anstrengungen unternommen, durch Automatisierung und Miniaturisierung eine möglichst hohe Anzahl von Proben und Sonden in möglichst kurzer Zeit untersuchen zu können.

[0004] Häufig wird dabei auf einem festen Träger eine Nucleinsäure, zumeist die Sonde, immobilisiert oder gleich an Ort und Stelle synthetisiert. Im letzteren Fall wird zunächst ein Startmolekül als Kupplungssubstanz, beispielsweise ein sogenannter Spacer oder Linker wie beispielsweise Bernsteinsäure oder Aminopropyl-Spacer, auf der Träger-Oberfläche fixiert.

[0005] Um an unterschiedlichen Orten auf dem Träger unterschiedliche Nucleinsäuren synthetisieren zu können, ist eine ortsabhängige, gesteuerte Reaktionsführung notwendig.

[0006] Insbesondere hat sich ein Synthese-Verfahren nach Fodor et al., Science 251, 767 (1991) etabliert, bei dem die benötigten Synthese-Bauelemente, nämlich Linker und einzelne Nucleoside, jeweils mit photolabilen Schutzgruppen ausgestattet sind. Beispiele für solche Schutzgruppen werden insbesondere von W. Pfeleiderer in "Biophosphates and Their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity", Elsevier (Amsterdam) 1987 angegeben.

[0007] Die zunächst auf dem Träger fixierten (geschützten) Linker-Moleküle werden an den Orten, an denen ein Syntheseschritt stattfinden soll, belichtet, wodurch dort die photolabilen Linker-Schutzgruppen entfernt und die Linker entschützt werden. Dann wird eine Lösung hydroxyl-geschützter (Desoxy-)Nucleoside appliziert. Diese werden an den photochemisch entschützten Linkern kovalent gebunden. Die nicht gebundenen Nucleoside werden vom Träger abgewaschen. Anschließend werden die ortsabhängige Belichtung (Entschützung weiterer Linker und/oder bereits angelagerter Nucleosid-Bauelemente) und die Zugabe von (weiteren) Nucleosid-Bauelementen (mit jeweils vorbestimmten Basen) so oft wiederholt, bis an jedem Kupplungs-ort des Trägers die Synthese abgeschlossen ist. Als Ergebnis liegt dann auf dem Träger ein Nucleinsäure-Array vor. Üblicherweise sind die an den Kupplungsstellen erzeugten, fixierten Oligonucleotide zwischen 6 und 30 Basen lang. Im Rahmen dieser Erfindung werden unter dem Begriff "Oligonucleotid" aber auch längere, z. B. 200 Basen lange Nucleinsäuren oder Polynucleotide, beispielsweise ganze Chromosomen, verstanden.

[0008] Moderne Geräte, mit denen das Verfahren nach Fodor et al. durchgeführt wird, verwenden Silizium-Chips, auf denen mit Hilfe von Photolithographie-Belichtungstechniken mehrere Zehntausend unterschiedliche Nucleinsäuren pro Chip synthetisiert werden. Diese Geräte sind jedoch, beispielsweise wegen der Reinheits- und Präzisionsanforderungen der Chip-Technik und der Photolithographie, in An-

schaffung und Betrieb sehr teuer, so daß sie nur für wenige große Firmen in Frage kommen. Außerdem besteht die Gefahr, daß mit einer einzigen Fehlbelichtung, beispielsweise durch eine im Bezug zum Träger-Chip minimal falsch ausgerichtete photolithographische Maske, alle auf dem Chip hergestellten Nucleinsäuren eine falsche Basenfolge besitzen und der gesamte Chip dadurch unbrauchbar ist.

[0009] Es war daher die primäre Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays anzugeben, das technisch einfach durchzuführen ist und vorzugsweise mit einer üblichen Antriebstechnik und mit üblichen (eventuell leicht modifizierten) Geräten durchgeführt werden kann.

[0010] Die gestellte Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays, mit folgenden Schritten:

## a) Bereitstellen

- einer Träger-Disk mit (zumindest) einer Untersuchungsseite, auf der an einer Anzahl von Kupplungsstellen photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen zur jeweiligen Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements (z. B. ein mit Schutzgruppen versehenes Nucleosid) angeordnet sind und

- einer Lichtquelle zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen an einzelnen Kupplungsstellen,

## b) Verkuppeln der Kupplungssubstanz an einem ersten Kupplungsstelle mit einem Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement, indem

- das Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement auf zumindest den ersten Kupplungsstelle appliziert,

- die Lichtquelle auf den ersten Kupplungsstelle gerichtet und

- die Kupplungsverbindung am ersten Kupplungsstelle durch Beleuchten mit der Lichtquelle aktiviert wird,

## c) Rotieren der Disk und/oder Verschieben von Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander, um die Lichtquelle auf einen weiteren Kupplungsstelle zu richten.

[0011] Besonders wichtig ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß die Träger-Disk gemäß Schritt c) zwischen zwei Kupplungsstellen (Syntheseschritten) rotiert wird. Durch diese Verfahrensführung wird nämlich auf vorteilhafte Weise nicht nur eine technisch einfach zu realisierende Bewegung des Trägers erreicht, sondern zusätzlich auch die Möglichkeit eröffnet, durch Fliehkräfte mechanisch einfach und unmittelbar auf die üblicherweise in flüssiger Darreichungsform (als Lösung oder Suspension) applizierten Oligonucleotide bzw. Oligonucleotid-Bauelemente einzuwirken.

[0012] Beispielsweise können unter der Wirkung von Fliehkräften sehr leicht Flüssigkeitstropfen auf der Träger-Disk-Oberfläche radial verschoben oder ganz vom Träger abgeschleudert werden. Letzteres ist bei den in Synthese- und Hybridisierungsverfahren üblicherweise notwendigen Waschschritten von besonderem Vorteil. Durch das Verschieben besonderer Oberflächenstrukturen, beispielsweise Kanäle oder durch besonders beschichtete, hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche der Trägeroberfläche kann bei einer Rotation die aufgrund der Fliehkraft induzierte Radial-Beschleunigung einer Flüssigkeit auf der Träger-Disk in eine Bewegung auf einer Kreis- oder Spiralbahn um die Rotationsachse umgesetzt werden. Insgesamt führen diese Vor-